

ヒト赤血球チトクローム b_5 の精製とその一次構造

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

金沢大学医学部第一生化学講座 (指導: 米山良昌教授・杉田良樹助教授)

井 本 正 樹

(昭和52年1月28日受付)

チトクローム b_5 (以下 Cyt b_5 と略す) は, Strittmatter と Ball¹⁾, Yoshikawa²⁾ (ただし, Yoshikawa は Cyt b' と命名した) によってラット肝臓のミクロゾーム分画で最初に発見されたヘム蛋白である³⁾. Cyt b_5 は哺乳類肝臓の小胞体膜に多量に存在しているが, 副腎⁴⁾, 腎臓²⁾⁵⁾, 卵巣²⁾, 乳腺⁶⁾⁷⁾, 脾臓⁸⁾ など種々の組織の小胞体膜にも存在し, その他にミトコンドリアの外膜⁹⁾¹⁰⁾ にも含まれている事が確認されているが, Cyt b_5 に関する研究は主に肝臓小胞体のものに就いてなされてきたのが現状である.

Cyt b_5 の機能は肝臓小胞体においては脂肪酸の不飽和化反応に関与する事が明らかとなってきた¹⁰⁾¹¹⁾. 一方, ヒト赤血球において Cyt b_5 がメトヘモグロビン (以下メト Hb と略す) 還元に関与する可能性を示唆する報告もなされていたが¹²⁾, 成熟の過程で小胞体を失ってしまうヒト成熟赤血球における Cyt b_5 の存否は不明であった.

1971年, Hultquist ら^{13)~15)} はヒト成熟赤血球の可溶性分画より Cyt b_5 を発見精製したと報告し, 同時に精製した NADH-dehydrogenase と Cyt b_5 の存在下でメト Hb の還元は促進されるが, Cyt b_5 が存在しないとメト Hb 還元が殆んど起らない事から, 赤血球内でのメト Hb 還元は酵素的に還元された Cyt b_5 によって起ると推定した.

同年, 杉田ら¹⁶⁾ は先天性メト Hb 血症患者において欠如しているがゆえにメト Hb 還元に関与していると考えられている Pyridine nucleotide dehydrogenase を精製し, 本酵素の最も強い電子受容体が Cyt b_5 でありメト Hb でない事, また Cyt b_5 が存在するときのメト Hb 還元速度と Cyt b_5 還元速度が等しい事から, 精製した Pyridine nucleotide dehydrogenase は Cyt b_5 reductase であり, メ

ト Hb は還元型 Cyt b_5 によって非酵素的に還元される事をウサギ肝臓 Cyt b_5 を用いて証明し, 赤血球内メト Hb 還元の電子伝達形成が $\text{NADH} \rightarrow \text{Cyt } b_5 \text{ reductase} \rightarrow \text{Cyt } b_5 \rightarrow \text{メト Hb}$ という一連の系でなされる事を実証した.

さて, 新生児は種々の薬剤によりメト Hb 血症をきたしやすい¹⁷⁾ が, その原因は赤血球内 Cyt b_5 reductase 活性が低いためと考えられている. アニリン色素を含んだインクでマークされたおむつ, ペンゾカインを含んだ軟膏, レゾルシンを含んだローションの塗布で新生児がよくメト Hb 血症をおこすのはこのためである. ヒト赤血球内の Cyt b_5 量に関しては今まで報告がなく, 成人と胎児, 新生児における量的差異等の問題はこれからの研究課題であろう.

ところで, 肝臓小胞体から Cyt b_5 を精製する場合精製法の違いにより異なる二種の Cyt b_5 標品が得られる¹⁸⁾¹⁹⁾. 一つは酵素的な分解によりもとの大きさより小分子化して抽出されてくるもので, 通常 Cyt b_5 (trypsin 処置) と呼ばれる. 他の一つは界面活性剤によりもとの大きさのままで分散されてくるもので, 通常 Cyt b_5 (deoxycholate 処置) と呼ばれる.

Cyt b_5 (trypsin 処置) は大きさが Cyt b_5 全分子の約2/3程度に相当し, 小胞体膜より水層へ露出していると考えられる親水性の部分が膜より切り離されて抽出されてきたもので, ヘムを含み²⁰⁾, Cyt b_5 としての生理活性や分光学的な特性はこの部分に存在している. またこの部分は完全な水溶性球状蛋白の性格を有していて, 高度に精製結晶化²¹⁾ されて, 一次構造^{22)~24)} 及び三次構造²⁵⁾²⁶⁾ その他の分子的特性²⁷⁾²⁸⁾ が明らかにされつつある.

一方, Cyt b_5 (deoxycholate 処置) は, Cyt b_5

The purification and primary structure of human erythrocyte cytochrome b_5 Masaki Imoto, Department of Obstetrics & Gynecology (Director: Prof. E. Nishida), Department of Biochemistry (I) (Director: Profs. Y. Yoneyama & Y. Sugita), School of Medicine, Kanazawa University.

(trypsin 処置) 部以外に本来は膜のリピド相と結合していたと思われる疎水性の部分をも含む蛋白質分子である^{39,40)}から、界面活性剤がないと重合する^{18,19)}ため精製が困難で、純粋で単一な分子種が得られにくい。従ってその構造や性質には不明確な点が多く、疎水性部分の一次構造も未だ決定されていない。

さて赤血球 Cyt b_5 と肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) を比較すると、両者とも補欠分子族がプロトヘム IX である事^{14,41)}、分光学的に可視部及び電子磁気共鳴スペクトルが類似している事^{14,41)}、酵素学的に両者とも赤血球 Cyt b_5 reductase の電子受容体となり得る事^{15,16)} などより両者は近似した構造を有すると推定されるが、一方は可溶性分画に他方はミクロゾーム分画にと細胞内での存在様式も異なる両 Cyt b_5 分子が同一のものがどうかを証明するためには、最終的には一次構造の決定が必要である。

本論文においてヒト赤血球可溶性分画に存在する Cyt b_5 がヒト肝臓ミクロゾーム分画に存在する Cyt b_5 とどの程度同一のものであるかを調べるために、ヒト赤血球を大量処置する事によって分離精製した均質の Cyt b_5 標品を用いて、一次構造の決定を試み、既に知られているヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) の一次構造と比較検討した。

実験材料

ヒト赤血球は日本赤十字血液センターの御厚意により得たものである。ヒト肝臓は金沢大学第一病理学教室の御厚意により得たものである。Amberlite A.G. IRC-50 はロームアンドハースト社、Sephadex G-75, G-50及びG-25は Pharmacia, PM-10 ultrafiltration membrane は Amicon の製品をそれぞれ用いた。他のすべての化学試薬は市販されているものを使用した。

実験方法

I. カルボキシメチル化

Crestfield ら⁴²⁾の方法を一部改変してカルボキシメチル化 (以下 CM 化と略す) を行なった。すなわち、Cyt b_5 10mg に塩酸グアニジン 1.44g、5% EDTA (2Na) 溶液 0.1ml、1.44M トリス塩酸緩衝液 1ml を加え更に水で全量 2.5 ml とした。この溶液に窒素ガスを 10分間通気し β -メルカプトエタール 0.33ml を加えたのち、室温で 4時間放置した。この間 1時間毎に 10分間窒素ガスを通気した。つぎに 1N 水酸化ナトリウム 0.33ml に溶かしたモノヨード酢酸 0.09g を加え、15分間遮光して放置したあと 10% 酢酸溶液で平衡

化した Sephadex G-25 カラム (1.5×80cm) で脱塩し、Cyt b_5 分画を集め凍結乾燥した。

II. アミノ酸分析⁴³⁾

蛋白及びペプチドに 6N 塩酸 0.5ml を加えて減圧封管し、110°C で 24 時間加水分解したあと乾固して塩酸を除きアミノ酸自動分析計 (日立 KLA-5 型) でアミノ酸分析した。

III. Edman 法⁴⁴⁾による N 末端からのアミノ酸配列の決定。

1. PTC-カップリング反応

凍結乾燥した適当量の蛋白質或はペプチドを試験管にとり 0.3ml のジメチルアリルアミン (以下 DMAA と略す) 緩衝液 pH 9.5 に溶かした。次に 10 μ l のフェニルイソチオシアナート (以下 PTC と略す) 溶液を加えて 15 秒間 N_2 ガスを吹き込み、試験管内の空気と置換したあと共栓をして 40°C に 1 時間おき、反応中ときどき振り混ぜた。ついでベンゼン 2ml を加えミキサーで 30 秒間かくはんしたあと、3000r.p.m.、5 分間遠心しベンゼン層を除いた。上記の操作を更にベンゼンで 1 回、酢酸エチルで 2 回、最後に再びベンゼンで 1 回と合計 5 回行ない未反応の PTC を除いた。また、最後に N_2 ガスでベンゼンを充分除いた。残った水層を凍結乾燥し、30分後凍結乾燥したままの状態で 40°C に加温し、更に 30分間保温しつつ DMAA を昇華除去した。

2. 環化反応

得られた PTC-ペプチドに 10 μ l のトリフルオロ酢酸 (以下 TFA と略す) を加えて軽く振とうし、10 秒間 N_2 ガスを吹き込み共栓をして 40°C、20分間保温した。そのあと 1ml のエチレンジクロリド (以下 $EtCl_2$ と略す) 溶液を加えミキサーで激しくかくはんしたのち生じる沈澱を 3,000r.p.m.、5 分間遠心分離し、チアゾリノン誘導体の含まれる $EtCl_2$ 層を他の試験管に移し、残った沈澱に再び 1ml の $EtCl_2$ を加え上記の操作をくり返し $EtCl_2$ 層を集めたあと、ただちに室温で N_2 ガスを吹き込みつつ濃縮乾固した。一方、沈澱を含むもの試験管はデシケータ中で 1 時間減圧乾燥してから第 2 段階目の PTC 化に用いた。

3. PTH-アミノ酸形成反応

上記の操作で得た $EtCl_2$ 層の乾固物を 1N HCl 0.3ml に溶かしたあと、15 秒間 N_2 ガスを通じ、共栓をして 80°C、10 分間加温しつつ相当するフェニルチオヒダントインアミノ酸 (以下 PTH-アミノ酸と略す) に変えた。冷却後、反応液に 1ml の酢酸エチル溶液を加え、ミキサーで 30 秒間かくはんしたあと、3,000r.p.m.、5 分間遠心し PTH-アミノ酸を含む酢酸エチ

ル層を別の試験管に移した。上記の操作を計3回くり返した。計3回の抽出で集めた酢酸エチル層と水層は N_2 ガスを吹き込みつつ蒸発乾固した。

4. PTH-アミノ酸の大まかな定量と同定

乾固した PTH-アミノ酸に50 μ lの酢酸エチル溶液を加えてよく溶かし、その中の10 μ lを3mlのエタノールに溶かして紫外吸収曲線をとる。PTH-アミノ酸の大まかな定量を行なった。残り40 μ lは標準 PTH-アミノ酸混合液と一緒に chromatogram sheet (Eastman 社製, 20 \times 20cm) にスポットした。この sheet をヘプタン・プロピオン酸・エチレンクロリド (58:17:25 V/V) 混合液を展開溶媒として上昇法で展開した。展開後、sheet を室温にて5~10分間風乾してからマナスライトで標準試料と比較しながら PTH-アミノ酸を検出し、更に sheet に0.2% ニヒドリン・n-ブタノール溶液をふんむしたあと、100°C、10分間加温し、標準試料の発色色調との比較から当該 PTH-アミノ酸を同定した。また、PTH-Arg, PTH-His, PTH-Cys SO_3H などの水溶性 PTH-アミノ酸の同定は、濾紙電気泳動法によった。

IV. Dansyl 法による N 末端アミノ酸残基の決定⁽⁴⁾

約4nmoleのペプチドを小試験管に入れ、10 μ lの0.1M $NaHCO_3$ に溶解して減圧乾固し試料中のアンモニアを除く。つぎに10 μ lの0.2M $NaHCO_3$ 溶液と10 μ lの0.3% ダンシルクロリド・アセトン溶液を加えかくはんし、パラフィルムで栓をし1時間37°Cに保つ。減圧乾固してから50 μ lの6N HCl を加え減圧封管し、105°Cで18時間加水分解してN末端アミノ酸のダンシル誘導体を遊離する。放冷後開管、減圧乾固し、乾固物を50 μ lの50%ピリジンに溶解し、ポリアミドシート (5 \times 5cm) で2次元に展開する。一次元展開液は1.5% (V/V) ギ酸を用いた。二次元目は一次元目と直角の方向にベンゼン:酢酸 (9:1) でまず展開し、ついで同方向に酢酸エチル:メタノール:酢酸 (20:1:1) で3回目の展開をした。

V. トリチウム交換法による C 末端分析⁽⁴⁾

ペプチド0.1 μ moleをトリチウム水5 μ l (500 μ Ci) とピリジン10 μ lとで溶解する。水で冷却しながら10 μ lの無水酢酸を加えパラフィルムで栓をし、0°Cに5分間、20°Cに15分間保ち、更に20 μ lのピリジンと20 μ lの無水酢酸を加え0°Cに5分間、20°Cに1時間保ち交換反応を行う。ついで5 μ lのトリチウム水を加え20°Cに1時間保ち無水酢酸を分解する。溶液を水冷しドライアイス・アセトンを用いて蒸留する。0.1mlの10%酢酸を加え蒸留し、交換可能なトリチウムを除く操作を5回繰返す。得られた試料を6N HCl 0.3ml

で定法に従いアミノ酸に加水分解する。アミノ酸の分離はpH6.4の濾紙電気泳動で行い、塩基性アミノ酸はさらにペーパークロマトグラフィー (ピリジン:アセトン:28% NH_4OH :水=50:20:5:5 V/V) で分離し、濾紙上のトリチウムの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

VI. トリプシン分解⁽⁷⁾

CM 化した Cyt b₅ 10mgを1% NH_4HCO_3 (pH 8.0) 2mlに溶かし、0.15%トリプシンを約40 μ l (蛋白重量の1/150量) に加え、36°C、3時間消化した。この消化物に0.5mlの水を加えて合計4回最後にデシケータ内で五酸化リン上で一晚乾燥した。

VII. ペプチドマップ法⁽⁸⁾

ペプチドマップは、Cyt b₅ のトリプシン消化物をペーパー・クロマト法と高圧濾紙電気泳動法で二次元に以下の条件で展開して作製した。

1. ペーパー・クロマトグラフィー

凍結乾燥した Cyt b₅ トリプシンペプチドの1~2mgを30%酢酸50 μ lに溶かし、凍洋濾紙No.51A (60 \times 60cm) の一辺から18cm、他辺 (展開液に浸す辺) から10cmの位置 (原点) にスポットした。この際スポット径が1.5cmとなるようにした。また原点と同じ高さで濾紙の両端より3cmの位置にニュートラル・レッドをマーカーとしてスポットした。展開液として、n-ブタノール・ピリジン・酢酸・水 (15:10:3:1 V/V) の混合液を用い、下降法により濾紙の線維の方向と直角の方向へ恒温箱で25°Cで、40~50時間展開した。展開後、濾紙を恒温箱で45°C、24時間乾燥した。

2. 高圧濾紙電気泳動

乾燥した濾紙の上1cm、下2.5cmを切って除きアイロンで伸す。つぎに泳動の標準物質として酸性、中性、塩基性アミノ酸のグルタミン酸、アラニン、アルギニンの混合液を濾紙の両端から3cm内側の位置にスポットした。最後に緩衝液pH3.7 (ピリジン:酢酸:水=1:10:289 V/V) 70mlを濾紙にふんむして、ペーパー・クロマトグラフィーの展開方向と直角の方向へ泳動距離の長い方を陰極側とし、3000V、60~80mAで60分間泳動した。泳動後45°Cで、24時間乾燥した。

3. 部分発色

3%ピリジン・アセトン溶液 (V/V) 20mlを濾紙一枚にふんむし、ドライヤーで乾燥したあと、フルオレスカミン・アセトン溶液⁽⁹⁾ (0.005%W/V) 10mlをふんむし、マナスライトでスポットの位置を確認し印を付けた。

4. ペプチドの抽出⁵⁰⁾

スポットの部分を切り出し、30%酢酸で抽出したあと凍結乾燥した。

実験結果

I. ヒト赤血球 Cyt b_5 の精製

最初の2 steps は Passon ら¹⁴⁾の方法に従い、Step (3)からは蛋白質が高分子両性電解質である事を利用して分離を行なうイオン交換カラム・クロマトグラフィーと、蛋白質分子の大きさや形状の差を利用して分離を行なうセファデックス・クロマトグラフィーを用いて精製した。特別の記載がない限り、すべての操作は $0^\circ \sim 4^\circ \text{C}$ で行なった。

Step (1) 赤血球の溶血及び膜の除去

10 lの保存赤血球を3000r.p.m., 5分間遠心し血漿を除く。残余の血漿を除くために赤血球を生理的食塩水で3度洗う。こうして得られた約7.5 lの赤血球を2.5 lづつ3つに分け、各々に7.5 lの冷水を加えて溶血させる。希塩酸を加えて pH6.0 とした溶血液を6,000 r.p.m., 10分間遠心し赤血球膜を除く。

Step (2) Amberlite IRC-50 によるヘモグロビン除去

上清(7.5 l \times 3)をpH6.0に再調整する。あらかじめpH6.0, 0.05Mリン酸カリウム緩衝液(以下P.B.と略す)で平衡化した5 lの Amberlite IRC-50 を一度冷蒸留水で洗った後に溶血液上清を加え、3時間かくはん混合して樹脂にヘモグロビンを吸着させる。つぎに傾斜して上清(7.5 l \times 3)を集め、更に等量の冷水(7.5 l \times 3)にて樹脂を洗い再度傾斜して両者を合わせ(15 l \times 3)。薄い KOH 溶液でpH7.2とする。

Step (3) DEAE-Cellulose カラム・クロマトグラフィー

pH7.2, 0.005M P.B. で平衡化した3本の DEAE-Cellulose カラム(4 \times 30cm)へ溶血液を1時間0.5 lの速度で流し Cyt b_5 を吸着させたあと、各カラムをpH7.2, 0.05M P.B. で充分洗い大部分のヘモグロビンを除く。つぎに2 MのKClを含む700mlのpH7.2, 0.2M P.B. で Cyt b_5 を溶出する。

Step (4) Sephadex G-75 によるゲル濾過

溶出した Cyt b_5 溶液(約2.1 l)をDiaflow membrane PM-10 にて濃縮し、最後の50 mlとなった所で水を3倍量加えて濃縮を続け約15 mlとする。これを10,000r.p.m., 10分間遠心して上清をとりpH6.8, 10mM P.B. で平衡化した Sephadex G-75 カラム(3 \times 130cm)につける。同緩衝液で1時間10 mlの速度で流出し、13 mlづつ集める。溶出パターンを

図1に示す。図1に示されるように3つのピークが得られ、溶出の順序に従ってそれぞれ P_{420} 分画, メト Hb 分画, Cyt b_5 分画である。

Step (5) Sephadex G-50 によるゲル濾過 (1 回目)

Step (4) で得られた Cyt b_5 分画の3回分を合わせて Diaflow membrane PM-10 で10 mlにまで濃縮し、pH6.8, 0.05M P.B. で平衡化した Sephadex G-50 カラム(3 \times 90cm)へつける。同緩衝液で1時間15 mlの速度で流出し、10 mlづつ集める。溶出パターンを図2に示す。

Step (6) Sephadex G-50 によるゲル濾過 (2 回目)

Step (5) で得られた Cyt b_5 分画を Diaflow

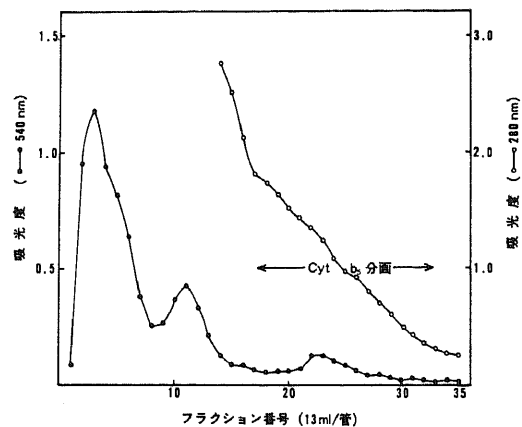


図1 Sephadex G-75 によるゲル濾過

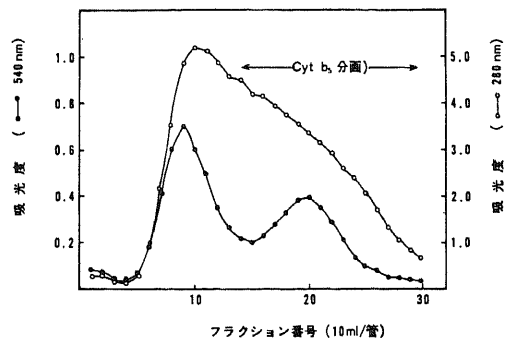


図2 Sephadex G-50 によるゲル濾過 (1 回目)

membrane PM-10 で10mlに濃縮し、Step (5) と同条件で平衡化した Sephadex G-50 へつけ、同緩衝液で1時間15mlの速度で流出し、13mlづつ集める。溶出パターンを図3に示す。

Step (7) DE-32 カラム・クロマトグラフィー

Step (6) で得られた Cyt b_5 分画を2倍希釈して pH6.8に調整したあと、pH6.8, 0.05M P.B. で平衡化した DE-32 カラム (1×10cm) へ吸着させる。

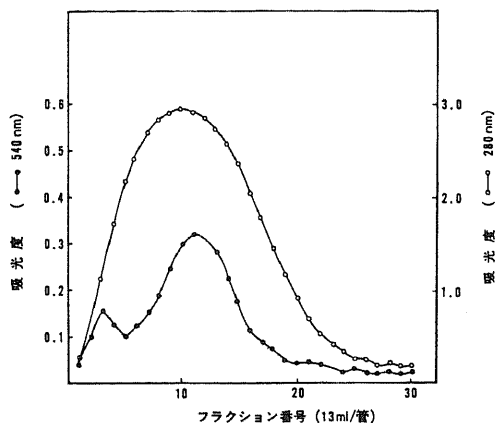


図3 Sephadex G-50 によるゲル濾過 (2回目)

同緩衝液50mlでカラムを洗ったあと、pH6.8, 0.05M P.B. と pH6.8, 0.2M P.B. 各々200mlの linear gradient で Cyt b_5 を溶出する。溶出速度は1時間20 mlとし、7 mlづつ集める。溶出パターンを図4に示す。図4の赤く色のついた部分で OD413/OD280 比が2.3以上の部分を集め、pH7.6に調整したのち pH7.6, 0.05M P.B. で平衡化した DE-32 カラム (1×2 cm) へ吸着させ、少量の NaCl を含む pH7.6, 0.2M P.B. で約2 mlに濃縮して溶出する。濃縮された Cyt b_5 を Sephadex G-25 カラム (3×20cm) で脱塩する。

以上の精製の各段階における結果を表1にまとめた。精製された Cyt b_5 標品の収量は、Cyt b_5 の推定分子量を15,000とし、また530m μ における1 mM当りの吸光度を10として計算すると、赤血球10 l当り2.25 mgであった。ここで“精製された Cyt b_5 標品。”とは、上記した精製法に従って精製された Cyt b_5 で、OD413/OD280 比が3.0以上、polyacryl amide disc 電気泳動で単一のバンドを示すものをいい、この条件を満たすものを以下で述べる一次構造の分析に用いた。また精製の結果、上記条件を満たさぬ場合は再度 DE-32 カラム・クロマトグラフィーを行なった。

またヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) は、大村ら⁵¹⁾の方法に従って精製した。

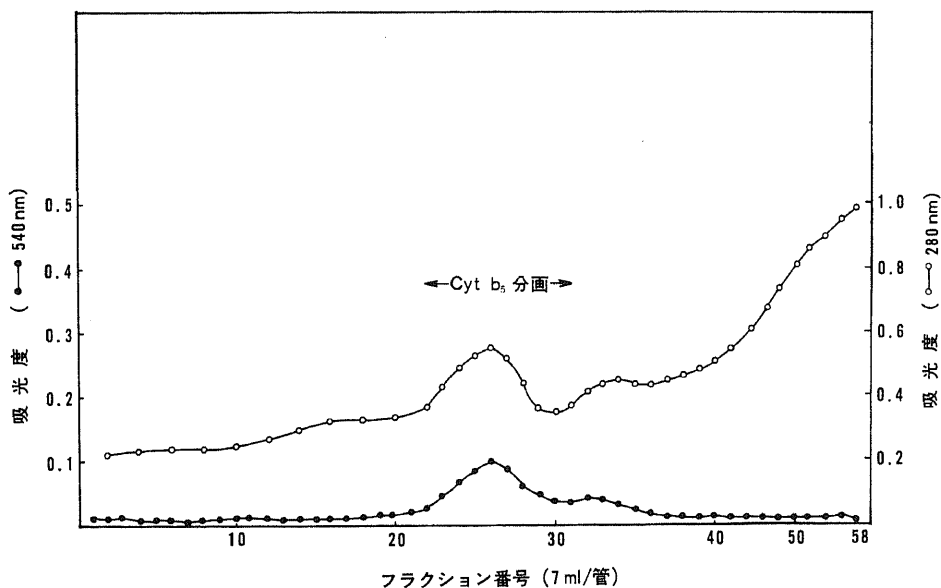


図4 DE-32 カラム・クロマトグラフィー

II. 精製ヒト赤血球 Cyt b_5 の性質

1. 精製 Cyt b_5 の均質性

最も精製された Cyt b_5 の polyacryl amide gel による disc 電気泳動⁵²⁾を行ない、泳動終了後アミドブラックでタンパク質を染色した。図5に示すように単一のバンドが得られた。

2. 分子量

最も精製された Cyt b_5 の SDS acrylamide gel による disc 電気泳動⁵³⁾を行ない、図6に示す如く分子量は14,000と推定された。標準蛋白として用いた ovalbumin, chymotrypsinogen, cytochrome c の分子量をそれぞれ45,000, 25,000, 12,500として算定した。

3. 吸収スペクトル

最も精製された Cyt b_5 の吸収スペクトルを日立 124 Spectrophotometer で測定した結果を図7に示す。図7に示されるように、Cyt b_5 をジチオナイドで還元した際の還元型吸収スペクトルのピークは423, 527, 556nmにあった。

III. ヒト赤血球 Cyt b_5 の全アミノ酸組成

精製されたヒト赤血球 Cyt b_5 標品を CM 化したあとアミノ酸分析して得た結果を、Ozols がヒト肝臓ミクロゾームよりトリプシン及びデオキシコール酸で抽出して得た Cyt b_5 標品について報告しているアミノ酸分析値と共に表2に示した。

表2に示すように、ヒト赤血球 Cyt b_5 の全アミノ

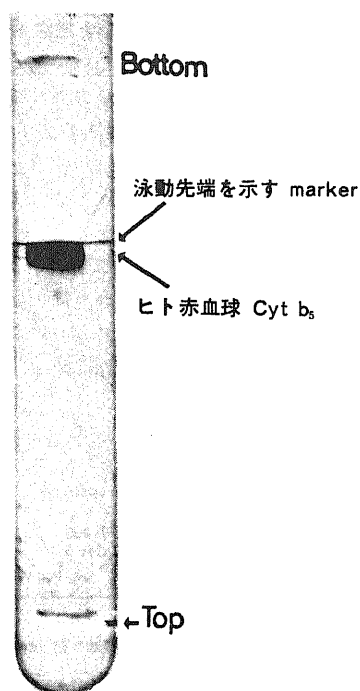


図5 精製ヒト赤血球Cyt b_5 のディスク電気泳動

表1 ヒト赤血球 Cyt b_5 の精製

Steps	量(ml)	吸光度 A 280 nm	吸光度 A 540 nm	$\frac{A\ 540\ nm}{A\ 280\ nm}$	$\frac{A\ 413\ nm}{A\ 280\ nm}$
(1) 溶血	7,500	$1.05 \times$	0.48×10^2		
(2) Amberlite IRC-50 上清	15,000	$0.145 \times$	0.131×10^2		
(3) DEAE-Cellulose	2,250	3.38	0.48		
(4) Sephadex G-75	221	1.02	0.06	0.058	
(5) Sephadex G-50 (1回目)	170	2.67	0.20	0.074	
(6) Sephadex G-50 (2回目)	182	2.29	0.18	0.078	
(7) DE-32	56	0.46	0.13	0.28	3.64

* Step (5)からは、Step (4)の Cyt b_5 部分の3回分を合わせて精製した。

酸残基数は2回のアミノ酸分析の平均値から約132個と推定され、ヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) よりも約40残基多く、ヒト肝臓 Cyt b_5 (deoxycholate 処置) よりも約数残基少ないと推定された。

IV. N末端分析

精製されたヒト赤血球 Cyt b_5 のN末端は、Edman 法及び Dansyl 法で同定されなかった。

V. C末端分析

精製されたヒト赤血球 Cyt b_5 のC末端は、トリ

チウム交換法によるC末端分析で Lysine と同定された。

VI. ヒト赤血球 Cyt b_5 及びヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) のペプチドマップ

ヒト赤血球 Cyt b_5 及びヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) を CM 化したあとトリプシン消化して得たトリプシンペプチドを東洋濾紙No.51A上で2次元に展開して作製したペプチドマップを図8に示した。ヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) 及びヒト赤血球

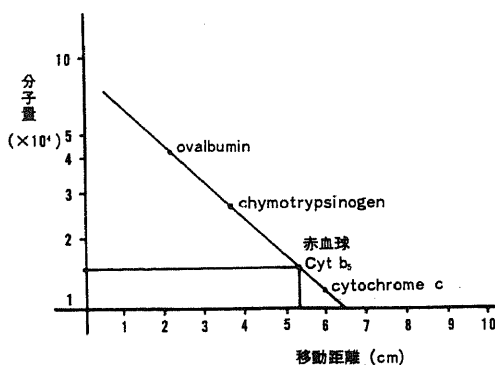


図6 SDS を含むポリアクリルカミドゲル電気泳動による分子量測定

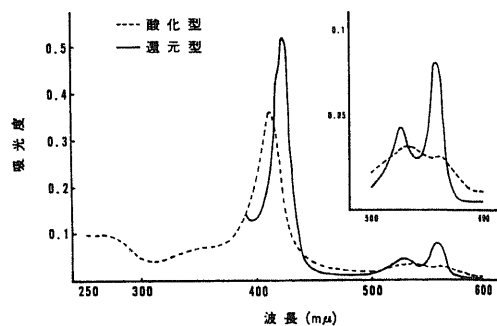
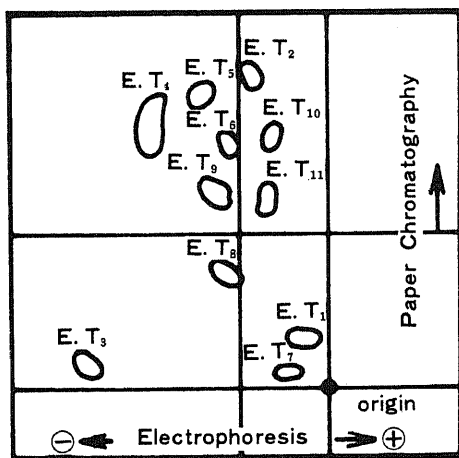
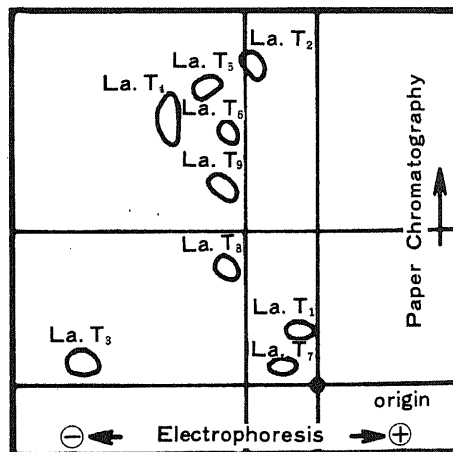


図7 精製ヒト赤血球 Cyt b_5 の吸収スペクトル



(A) ヒト赤血球 Cyt b_5



(B) ヒト肝臓 Cyt b_5 (トリプシン処置)

図8 ヒト赤血球 Cyt b_5 とヒト肝臓 Cyt b_5 (トリプシン処置) のトリプシンペプチドのペプチドマップ

Cyt b₅ のペプチドマップにはそれぞれ9個, 11個のスポットが検出された。また, スポットの位置から両者を比較すると, ヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) で検出される全てのスポットに対応するスポットがヒト赤血球 Cyt b₅ のペプチドマップでも検出された。対応する各スポットにそれぞれ La.T₁~La.T₉, E.T₁~E.T₉ なるペプチド番号をつけた。

また, ヒト赤血球 Cyt b₅ にはヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) には存在せぬ2個の新たなスポットが検出され, それぞれ E.T₁₀, E.T₁₁ とペプチド番号をつけた。

VII. ヒト赤血球 Cyt b₅ 及びヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) のトリプシンペプチドのアミノ酸組成

ヒト赤血球 Cyt b₅ のペプチドマップ上の E.T₁ から E.T₉ までの9個のトリプシンペプチドをアミノ酸分析して得た結果を, それと対応すると推定される Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) のトリプシンペプチド (Lb.T₁~Lb.T₉) のアミノ酸組成と共に表3に示した。

また, ヒト赤血球 Cyt b₅ では検出されるがヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) では検出されない E.T₁₀, E.T₁₁ 両トリプシンペプチドのアミノ酸組成を表4に示した。同時に, Ozols^{32,34)} 及び Spatz と Strittmatter ら¹⁹⁾ の報告したヒト, ブタ, ウシ, ウサギ肝臓 Cyt b₅ の疎水性 "尾部" ペプチドのアミノ酸組成値 (deoxycholate 処置標品と trypsin 処置標品両者のアミノ酸組成値の差) と, 著者らの精製した

表2 ヒト赤血球 Cytb₅ の全アミノ酸組成

Amino Acids	ヒト赤血球 Cyt b ₅			ヒト肝臓 Cyt b ₅		
	1回目	2回目	平均値	トリプシン処理	デオキシコール酸処置	
Lys	11	11	11	a) 7	b) 9	c) 9
His	6	7	7	7	8	8
Arg	4	5	5	3	4	4
CM-Cys						
Trp	(2)	(2)	(2)	1	4	4
Asx	14	16	15	10	13	13
Thr	7	7	7	6	10	10
Ser	6	5	6	5	10	10
Glx	20	24	22	17	19	22
Pro	6	8	7	3	5	5
Gly	9	9	9	6	6	6
Ala	8	8	8	5	9	11
Val	7	7	7	4	7	8
Met	2	2	2	1	3	4
Ile	5	5	5	4	8	8
Leu	11	11	11	7	12	12
Tyr	3	3	3	3	5	5
Phe	5	5	5	3	3	3
No. of Residues	126	135	132	92	135	142

- a) Nobrega と Ozols ら 文献 (31) より
 b) Ozols 文献 (32) より
 c) Ozols 文献 (34) より

ヒト赤血球 Cyt b₅ の全アミノ酸組成値と E.T₁ から E.T₉ までの各トリプシンペプチドに含まれるアミノ酸組成値との差も併記した。

表3に示すように、著者らの精製したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) で検出される La.T₁ から La.T₉ の各トリプシンペプチドのアミノ酸組成は、Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) の各トリプシンペプチドのアミノ酸組成と La.T₄ の Trp 1 残基が失欠している点を除いて完全に一致した。La.T₄ の Trp 1 残基の失欠はアミノ酸分析中の Trp 残基の破壊によって起った可能性が強いと推定される。

また、ヒト赤血球 Cyt b₅ の E.T₁ から E.T₉ までの各トリプシンペプチドに特定な残基の含有量を基準として計算したアミノ酸組成値 (表3のE) の小数第1位を四捨五入して得たアミノ酸組成値と Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) の各トリプシンペプチドのアミノ酸組成値を比較すると、両者のアミノ酸組成はほぼ一致したが、E.T₂ の Tyr

2 残基及び E.T₄ の Trp 1 残基の失欠がみられた。しかし後述するように、Edman 分析により E.T₂ で Tyr 2 残基、E.T₄ で Trp 1 残基の存在が確認された事より、ヒト赤血球 Cyt b₅ と Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) の各々9個のトリプシンペプチドは相同のアミノ酸組成を有すると推定された。

ヒト赤血球 Cyt b₅ のみに検出される E.T₁₀、E.T₁₁ 両トリプシンペプチドのアミノ酸組成については表4に示すように、E.T₁₀ は24残基、E.T₁₁ は12残基よりなり、両者とも Lys 1, Arg 1 残基を含み特に E.T₁₀ は Met 1 残基を含む事が明らかとなった。また、両トリプシンペプチドのアミノ酸残基数の和は37残基で、これはヒト赤血球 Cyt b₅ の全アミノ酸組成値と E.T₁ から E.T₉ の各トリプシンペプチドに含まれるアミノ酸組成値の差 (約40残基) と比較すると両者は残基数からみて非常に近似した値を示し、また両者のアミノ酸組成も Lys 2, Pro 2, Ala 1, Val 1, Leu 1 残基の相違を示すのみで非常に近似した組

表3 Cyt b₅ のトリプシンペプチドのアミノ酸組成

E ヒト赤血球 Cytb₅ のペプチドマップ (図8A) より抽出したトリプシンペプチドのアミノ酸組成
La ヒト肝臓 Cytb₅ (トリプシン処置) のペプチドマップ (図8B) より抽出したトリプシンペプチドのアミノ酸組成
Lb ヒト肝臓 Cytb₅ (トリプシン処置) のトリプシンペプチドのアミノ酸組成, Nobrega と Ozols ら: 文献 (31) より

No. of Peptides	T ₁			T ₂			T ₃			T ₄			T ₅			T ₆			T ₇			T ₈			T ₉		
	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb	E	La	Lb
Amino Acids																											
Lys	0.97	0.92	1	0.88	1.06	1	1.12	1.12	1	1.11	1.09	1	1.00	0.97	1							1.00	0.91	1	1.06	1.05	1
His							1.60	1.78	2	1.63	1.72	2				0.87	0.78	1	0.97	1.00	1				1.06	1.00	1
Arg																0.93	1.05	1	1.21	1.02	1				1.24	1.29	1
CM-Cys																											
Trp										**	***	1															
Asx	2.00	2.02	2				1.32	0.89	1				1.17	0.71	1				3.73	3.92	4				1.94	1.90	2
Thr				0.97	0.97	1				0.90	1.23	1	1.02	1.32	1				2.18	2.01	2				0.94	0.76	1
Ser	0.64	0.97	1				1.32	1.25	1	0.74	0.91	1							0.76	0.88	1	1.10	1.18	1			
Glx	4.24	3.76	4	3.31	3.07	3										4.19	3.80	4	3.84	3.67	4	1.10	0.55	1	1.29	0.77	1
Pro																1.03	0.92	1							2.24	2.32	2
Gly																1.89	2.37	2	2.72	3.06	3				0.88	0.63	1
Ala	2.09	2.21	2																3.17	3.40	3						
Val	0.97	1.05	1										1.00	1.16	1	0.97	0.83	1	1.17	1.06	1						
Met																						0.50	0.57	1			
Ile				1.02	0.97	1				1.17	1.36	1													1.59	1.71	2
Leu				1.20	0.93	1				2.31	2.18	2	1.22	1.00	1	2.17	1.98	2							1.29	1.08	1
Tyr				*0.41	1.73	2							0.54	0.74	1												
Phe																0.63	0.75	1	1.06	1.01	1				0.92	0.91	1
No. of Residues	11	11	11	7	9	9	5	5	5	8	8	9	6	6	6	13	13	13	21	21	21	4	4	4	14	14	14

* E.T₂ を Edman 法で分析して Tyr 2 残基を同定した。

** E.T₄ を Edman 法で分析して Trp 1 残基を同定した。

*** La.T₄ のアミノ酸分析中、破壊されたと推定される Trp 残基。

成を示した。

Ⅷ. ヒト赤血球 Cyt b₅ トリプシンペプチドのアミノ酸配列順序

ヒト赤血球 Cyt b₅ のペプチドマップより E.T₁ から E.T₉ までの各トリプシンペプチドを抽出し、各ペプチドのアミノ酸配列の同定を Edman 法で行なった。その結果を表5に示す。

E.T₁: Edman 法で N 末端は同定されなかった。しかし本トリプシンペプチドは、Ozols がヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) の N 末端を含むトリプシンペプチドと報告しているものと相同のアミノ酸組成を有する事より Lb.T₁ と相同のアミノ酸配列を有する可能性が高いと推定され、また N 末端の α アミノ基はヒト肝臓 Cyt b₅ と同様 block されている可能性が高いと推定される。

E.T₂: N 末端より 2 段階目までの Edman 法で NH₂-Tyr-Tyr と同定された。本トリプシンペプチドのアミノ酸組成は表3に示すように Tyr 2 残基の失欠している点を除いて Lb.T₂ のアミノ酸組成と一

致する事、また Lb.T₂ のアミノ酸配列に関して Ozols もまた NH₂-Tyr-Tyr と報告している事より E.T₂ は Lb.T₂ と相同のアミノ酸配列を有すると推定され、表3で E.T₂ にみられた Tyr 2 残基の失欠はアミノ酸分析中の Tyr 残基の破壊によって起った可能性が高いと推定される。

E.T₃: Edman 法で N 末端は同定されなかった。しかし本トリプシンペプチドは Lb.T₃ と相同のアミノ酸組成を有する事より、Lb.T₃ と相同のアミノ酸配列を有する可能性が高いと推定される。

E.T₄: N 末端より 3 段階目までの Edman 法で、NH₂-Ser-Thr-Trp と同定された。E.T₄ のアミノ酸分析の結果は表3に示すように Lb.T₄ のアミノ酸組成に比べて Trp 1 残基の失欠が認められたが、本分析により E.T₄ に Trp が 1 残基存在する事が確認された事より、そのアミノ酸配列も Lb.T₄ と相同と推定される。

E.T₅~E.T₉: N 末端又は 2 段階目までの Edman 法で、各トリプシンペプチドのアミノ酸配列は Ozo-

表4 ヒト赤血球 Cyt b₅ のトリプシンペプチド (E. T₁₀, E. T₁₁) のアミノ酸組成

Amino Acids	Lys	His	Arg	CM-Cys	Trp	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	No. of Residues
E. T ₁₀	1		1			4	1	1	3	2	2	1	1	1	1	4		1	24
E. T ₁₁	1		1			1			2		1	3	1			1		1	12
E. T ₁₀ +E. T ₁₁	2		2		(1)	5	1	1	5	2	3	4	2	1	1	5		2	37
ヒト赤血球 Cyt b ₅ の疎水域ペプチド a)	4		2		1	5	1	1	5	4	3	3	3	1	1	4		2	40
ヒト肝臓 Cyt b ₅ の疎水性"尾部"ペプチド b)	2	1	1		3	3	4	5	2	2		4	3	2	4	5	2		43
ヒト肝臓 Cyt b ₅ の疎水性"尾部"ペプチド c)	2	1	1		2~3	4	4	5	8	2		7	4	3	4	5	2		54~55
ダタ肝臓 Cyt b ₅ の疎水性"尾部"ペプチド c)	4	1	1		2	6	5	9	9	2	2	5	4	2	4	3	3	2	64
ウシ肝臓 Cyt b ₅ の疎水性"尾部"ペプチド c)	1	1	1		3~4	5	4	5	7	4	1	5	2	1	5	5	2	2	54~55
ウサギ肝臓 Cyt b ₅ の疎水性"尾部"ペプチド d)	1		1		2~3	6	3	3	1	2	1	5	3	2	4	6	2	1	43~44

a) ヒト赤血球 Cyt b₅ の全アミノ酸組成と E. T₁~E. T₉ の各トリプシンペプチドに含まれるアミノ酸組成の差。

b) Ozols 文献 (32) より

c) Ozols 文献 (34) より

d) Spatz and Strittmatler 文献 (19) より

Is の報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) のそれと一致した。また対応する E.T₃~E.T₉ 及び Lb.T₃~Lb.T₉ 両トリプシンペプチドのアミノ酸組成も相同な事より、E.T₃~E.T₉ は Lb.T₃~Lb.T₉ の各トリプシンペプチドと相同のアミノ酸配列を有する可能性が強いと推定された。

考 察

ヒト赤血球 Cyt b₅ の精製に関して Passon ら¹⁴⁾ 及び Kuma³³⁾ の報告があるが、その一次構造に関する報告は未だない。著者らは Passon らの方法を改変してヒト赤血球 Cyt b₅ を精製した。精製したヒト赤血球 Cyt b₅ (表 1 の Step 7) は、OD413/OD280 比が3.0以上であり、また図 5 に示すように acryl amide disc 電気泳動で単一のバンドを示した。それゆえ著者らは上記の 2 条件を満たす Cyt b₅ 標品を用いて一次構造の分析を行なった。

最近、Hultquist ら³⁴⁾ は彼らの従来方法¹⁴⁾ に更に DEAE-Sephadex A-50 を加えてヒト赤血球 Cyt b₅ を精製し、OD413/OD280 比がそれぞれ2.4, 6.4, 3.8を示す Cyt b₅ 標品を得たとし、三標品はそれぞれ Cyt b₅ に特有の酸化型、還元型吸収スペクトルを示したと報告している。また、OD413/OD280 比が6.4を示す Cyt b₅ 標品は major form (赤血球 Cyt b₅ 全体の約90%) でその分子量は SDS 電気泳

動で15,300であり、他の 2 者標品については天然に存在する minor form か精製操作上の産物であるかのどちらかであろうと推論している。

また Kuma³³⁾ はその OD413/OD280 比は明らかに精製したヒト赤血球 Cyt b₅ の分子量は SDS 電気泳動で13,700と報告している。一方著者らが精製したヒト赤血球 Cyt b₅ は OD413/OD280 比が4.12 の標品では分子量は約15,000でアミノ酸残基数は約135個であった。

以上より著者らが精製し一次構造の分析に用いたヒト赤血球 Cyt b₅ 標品は、Hultquist らのいう major form とは異なる可能性は否定出来ないが、精製された Cyt b₅ 標品が acryl amide disc 電気泳動で単一のバンドを示す事から、一次構造分析に用うるに足る十分な精製度を有する標品と考えられる。また、その分子量は Hultquist らの報告した OD413/OD280比が6.4を示す Cyt b₅ 標品の分子量と近似している。

さて本研究において著者らは以下に述べる理由よりヒト赤血球 Cyt b₅ は表 6 に示すような一次構造を有し、その N 末端から第92残基まではヒト肝臓 Cyt b₅ の N 末端から第92残基までと相同の一次構造を有するものと推定した。なお表 6 には著者らの推定したヒト赤血球 Cyt b₅ の一次構造と共に Nobrega と Ozols ら³¹⁾, Ozols³²⁾ によって報告されたヒト肝臓

表5 ヒト赤血球 Cyt b₅ トリプシンペプチドのアミノ酸配列順序

ヒト赤血球 Cyt b ₅		ヒト肝臓 Cytb ₅ (トリプシン処置) *	
E. T ₁	同定されず	Lb. T ₁	(Asx·Glx)-Glu-Glu-Ala Lys
E. T ₂	Try-Tyr	Lb. T ₂	Tyr-Tyr-Thr-Leu Lys
E. T ₃	同定されず	Lb. T ₃	His-Ash-His-Ser-Lys
E. T ₄	Ser-Thr-Trp	Lb. T ₄	Ser-Thr-Trp-Leu-Ile Lys
E. T ₅	Val-Tyr	Lb. T ₅	Val-Tyr-Asp-Leu-Thr-Lys
E. T ₆	Phe-Leu	Lb. T ₆	Phe-Leu-Glu-Glu-His Arg
E. T ₇	Glu-Gln	Lb. T ₇	Glu-Gln-Ala-Glu-Gly Arg
E. T ₈	Glu-Met	Lb. T ₈	Glu-Met-Ser-Lys
E. T ₉	Thr	Lb. T ₉	Thr-Phe-Ile-Ile-Gly Lys-Pro-Arg
E. T ₁₀	同定されず		
E. T ₁₁	同定されず		

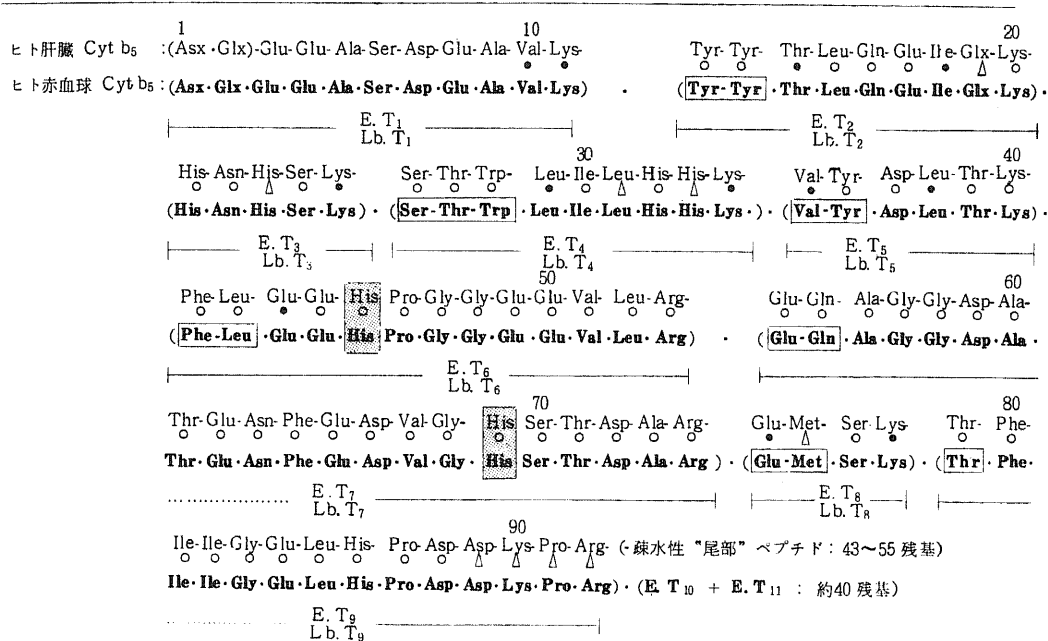
* ヒト赤血球 Cyt b₅ のトリプシンペプチドと、それと相同のアミノ酸組成を有するヒト肝臓 Cyt b₅ (トリプシン処置) のトリプシンペプチドのアミノ酸配列

Cyt b₅ の N 末端から第92残基までの一次構造を併記した。

著者らの得た実験結果ではヒト赤血球 Cyt b₅ をトリプシンでのみ分解したので、各トリプシンペプチドの配列位置及び配列順序に関して断定は出来ないが、ヒト赤血球及び肝臓 Cyt b₅ 両者のアミノ酸配列が N 末端から第92残基まで相同である事を示すものは以下の5項である。①ヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) は表6に示すように9個のトリプシンペプチドに分解し、著者らの精製したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) のトリプシン分解物もペプチドマップ上9個 (La.T₁~La.T₉) のスポットを示す (図8B)。またヒト赤血球 Cyt b₅ のペプチドマップ (図8A) にもヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) の各トリプシンペプチドと相同の位置に9個のスポット (E.T₁~E.T₉) が存在する。②図8で互いに相同の位置に存在す

るヒト肝臓及び赤血球 Cyt b₅ のそれぞれ9個のトリプシンペプチドのアミノ酸組成は表3及び表5から明らかに一致し、それらは Ozols らによって既に報告されたトリプシンペプチドのアミノ酸組成と相同である。③図8Aのヒト赤血球 Cyt b₅ に存在する E.T₂~E.T₉ の各スポットより抽出したトリプシンペプチドの N 末端側から数個のアミノ酸配列は、表5に示すように Ozols らの報告したヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) のトリプシンペプチドのアミノ酸配列と相同である。④ヒト肝臓 Cyt b₅ の trypsin 処置標品及び deoxycholate 処置標品両者の N 末端残基のαアミノ基は block されていると推定されているが、CM 化したヒト赤血球 Cyt b₅ の N 末端残基も Dansyl 法、Edman 法で検出されない。⑤図8Bのスポット La.T₁ はそのアミノ酸組成より Ozols がヒト肝臓 Cyt b₅ の N 末端残基を含むトリ

表6 著者らの推定したヒト赤血球 Cyt b₅ の一次構造



○ 哺乳類及びニワトリに共通のアミノ酸

● 哺乳類間のみ共通

△ 哺乳類間でも同一でないもの

□ Edman 法で同定し得たアミノ酸

■ で囲んだ His-45 と His-69 は、推定されるヘム鉄への配位アミノ酸

ブシンペプチドとしているものであるが、図 8A のヒト赤血球 Cyt b₅ にもそれに相当する位置にスポット E.T₁ が存在し、そのアミノ酸組成は Lb.T₁ と相同であり、更にその N 末端残基は Edman 法で検出されない。

表 6 の第 21 から第 25 残基のアミノ酸配列に関しては Nobrega と Ozols ら³¹⁾ はヒト肝臓 Cyt b₅ では His-Asn-His-Ser-Lys と報告しているが、Tsugita ら²⁷⁾ は His-Asn-Ser-Lys であるとして表 6 の第 23 位の His 残基が失欠していると報告している。図 8 に示されるように今回著者らの精製したヒト肝臓 Cyt b₅ の La.T₃ 及びヒト赤血球 Cyt b₅ の E.T₃ 両スポットの位置がほぼ一致し、また両トリブシンペプチドのアミノ酸組成は共に His 2, Asx 1, Lys 1, Ser 1 である事より E.T₃ 及び La.T₃ のアミノ酸配列に関しては Nobrega と Ozols ら³¹⁾ の報告がより信頼性が高いと考えられる。

ヒト赤血球 Cyt b₅ のヘム鉄への配位残基に関しては①ウシ肝臓 Cyt b₅ の X 線回析によりヘム鉄が His-45, His-69 に配位している事が確認されている^{35, 36)}。②本研究よりヒト赤血球 Cyt b₅ はヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) とほぼ相同の一次構造を有するものと考えられる。③更に表 6 に示されるように、ヒト赤血球 Cyt b₅ の第 44~74 残基までのアミノ酸配列はヒト肝臓 Cyt b₅ のアミノ酸配列と相同であると推定され、このアミノ酸配列は哺乳類のみならず鳥類においても共通している事などから、ヒト赤血球 Cyt b₅ においてもヘム鉄はウシ肝臓 Cyt b₅ と同様に第 5, 第 6 配位座とも His 残基が配位している可能性が高い。

Cyt b₅ は 1 分子中に親水域と疎水域とを有する^{18, 19)}。親水域とはヘムを含み生理活性を有しミクロゾーム膜より水層へ露出している部分で、これはまた肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) 標品とほぼ同様のものと考えてよい^{18, 19)}。またウサギ、ウシ肝臓の Cyt b₅ (trypsin 処置) は結晶化^{21, 37)} されその三次構造は Mathews ら^{35, 36)} によって決定されている。

一方疎水域とは Cyt b₅ の C 末端部の約 40~60 個のアミノ酸残基より成る部分で、このうち平均約 60% が疎水性アミノ酸残基 (Val, Met, Ile, Leu, Phe, Trp) より成るとされ、Cyt b₅ はこの疎水域をミクロゾーム膜の脂質二重層へ挿入して膜と結合していると考えられている^{34, 39, 40)}。

また、この Cyt b₅ 疎水性「尾部」ペプチドは同様に疎水性「尾部」ペプチドを有する Cyt b₅ reductase との膜面での相互作用の際に活性部を適当な位置

に保って相互作用を容易にすると考えられており^{55, 57)}、その 80% 以上がヘリックス構造を取っていて、更にこの疎水域を有するために水中で単分子に分散出来ずミセルを形成し、疎水性部分が更に大きくなると水に不溶性になると報告されている^{18, 19)}。また最近の円偏光二色性による分光学的な研究から、親水域と疎水域は約 15 個のアミノ酸残基よりなる領域間ペプチドによって連結されているとする報告もある^{58, 59)}。いづれにしても未だにこの疎水性「尾部」ペプチド (表 6 の第 93 残基以後) の全一次構造は決定されていない。

ところで図 8A のペプチドマップでヒト赤血球 Cyt b₅ によりみ検出される 2 個のトリブシンペプチド E.T₁₀ 及び E.T₁₁ の配列位置及び配列順序に関しては overlapping data が得られなかったため確定は出来なかった。それゆえ両ペプチドが表 6 の E.T₁~E.T₃ までのどこかに挿入される可能性も否定出来ない。しかし前記理由よりヒト赤血球 Cyt b₅ はヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) と相同の一次構造を有し、その N 末端残基の α アミノ基が block されていると推定される事より、E.T₁₀ 及び E.T₁₁ が E.T₁ の N 末端側へつく可能性は殆んどないと考えられ、両ペプチドは表 6 の第 93 残基以降に位置し、いわゆる疎水性「尾部」ペプチドの一部に相当する部分を形成している可能性が高いと推定される。

さて Ozols はヒト肝臓 Cyt b₅ (deoxycholate 処置) の疎水域のアミノ酸残基数及びアミノ酸組成について異った 2 つの報告^{32, 34)} をしている。1 つは Lys 2, Arg 2, Met 2 残基などを含む 43 アミノ酸残基よりなり、N 末端側は NH₂-Ile-Thr-Lys でその 40% を疎水性アミノ酸が占めると報告している³²⁾。他の一つは Lys 2, Arg 1, Met 3 残基などを含む 55 アミノ酸残基よりなり、その C 末端側は Leu-Tyr-Met-Ala-Asp-COOH で疎水性アミノ酸が 30% を占めると報告している³⁴⁾。

一方、本研究でヒト赤血球の E.T₁₀, E.T₁₁ 両ペプチドの N 末端残基及びそのアミノ酸配列を決定する事は出来なかったが、表 4 に示すように両ペプチドのアミノ酸残基数は 37 個で、Lys 2, Arg 2, Met 1 残基を含み約 30% が疎水性アミノ酸であった。また E.T₁₀, E.T₁₁ 両ペプチドのアミノ酸組成及び残基数は、ヒト赤血球 Cyt b₅ の全アミノ酸組成から親水域ペプチド (N 末端から第 92 残基まで) のアミノ酸組成及び残基数を引いた値と Lys 2, Pro 2, Ala 1, Val 1, Leu 1 残基の相違を除いてほぼ一致した。

ところで、E.T₁₀ 及び E.T₁₁ 両ペプチドと Ozols

の報告しているヒト肝臓 Cyt b_5 の疎水性「尾部」ペプチドを比較すると、全アミノ酸残基数では約6または18残基の差が認められ、またアミノ酸組成にはかなりの相違が認められる。一般にヒト、ウシ、ブタ、ウサギ等の肝臓 Cyt b_5 の親水域ペプチドは表6に示されるように非常に類似した一次構造、アミノ酸組成、アミノ酸残基数を有する^{30,31)}が、疎水域ペプチドのアミノ酸組成及び残基数は表4に示されるようになんかの相違が認められる³⁴⁾。この事は Cyt b_5 では活性中心を有する親水域のアミノ酸残基は機能に必須なものが多いために一次構造は非常に安定しており、進化の過程でアミノ酸の置換、失欠、付加等が起り難いが、疎水域では親水域ほど機能に必須でないために一次構造上の自由度が大きく、アミノ酸の置換等が比較的容易に起り易る事を示唆しているのかもしれない。しかし

Ozols は精製したヒト、ウシ、ウマ肝臓 Cyt b_5 (deoxycholate 処置) のC末端部が3者とも Glu-Asp-COOH と報告している³⁴⁾事から、各種間の疎水性「尾部」ペプチドの相違は単に各 Cyt b_5 標品の精製がまだ完全でない事によるのかもしれない。

本研究よりヒト肝臓 Cyt b_5 とヒト赤血球 Cyt b_5 両者の親水域は相同の一次構造を有すると推定されるが、その疎水域に関してはアミノ酸残基数及びアミノ酸組成上かなりの相違が認められる。この事は Cyt b_5 の組織或は臓器特異性が一次構造よりみて、その疎水域に表現される事を示唆しているものとも考えられ興味深い問題であるが、両者の疎水域ペプチドの完全な一次構造の決定がなされていない現在推論の域を出ない。

成熟赤血球可溶性 Cyt b_5 の由来について2つの場合が考えられる。一つは Cyt b_5 は網状赤血球の時期にはミクロゾーム Cyt b_5 としてミクロゾーム膜に結合して機能しているが、赤血球の成熟に伴って起る膜系の消滅と共に疎水性「尾部」ペプチドの特定の部分或は不特定の部分が切断され細胞質内へ遊離されてくるとする考え方で、他の一つは赤血球の場合には著者らの精製したようなヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) のC末端側に約40個のアミノ酸残基よりなるペプチドを有する Cyt b_5 が網状赤血球の時期にミクロゾーム Cyt b_5 とは別に生成されるとする考え方である。

この問題の解決はヒト成熟赤血球 Cyt b_5 と網状赤血球 Cyt b_5 (deoxycholate 処置) 両者の全一次構造の決定にかかっているといえよう。

結 論

ヒト成熟赤血球から Cyt b_5 を acryl amide disc 電気泳動で単一のバンドを示すまでに精製した。この Cyt b_5 標品を用いて一次構造の研究を行ない、既に一次構造の決定されているヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) と比較検討してつぎのような結果を得た。

1. ヒト赤血球 Cyt b_5 をカルボキシメチル化して全蛋白のアミノ酸分析をしたところ、全アミノ酸残基数は平均132個であった。N末端アミノ酸は Edman 法及び Dansyl 法で同定されなかった。C末端アミノ酸はトリチウム交換法によるC末端分析で Lysine と決定された。

2. ヒト赤血球 Cyt b_5 及びヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) のそれぞれのトリプシンペプチドからペプチドマップを作製した。前者で11、後者で9個のスポットが検出され、ヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) の全てのスポットに対応するスポットがヒト赤血球 Cyt b_5 に検出された。

3. ヒト赤血球 Cyt b_5 のペプチドマップ上、ヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) では検出されぬ新たな2個のトリプシンペプチドが検出された。一つは24個のアミノ酸残基よりなり Met 1 残基を含み、他の一つは12個のアミノ酸残基よりなり、両者とも Lys 1, Arg 1 残基を含んでいた。

4. 著者らの精製したヒト赤血球 Cyt b_5 とヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) 両者のペプチドマップ上、相同の位置に検出される9個のトリプシンペプチドのアミノ酸組成は完全に一致し、この値はまたアミノ酸分析中に破壊されたと推定される Trp 1 残基の失欠している点を除いて Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) に存在する9個のトリプシンペプチドのアミノ酸組成と一致した。

5. ヒト赤血球 Cyt b_5 及びヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) に存在する相同の8個のトリプシンペプチド(6で述べるペプチド1個を除く)のN末端から数個のアミノ酸配列は、Ozols の報告したヒト肝臓 Cyt b_5 (trypsin 処置) に存在する9個のトリプシンペプチドのそれと完全に一致した。

6. Ozols はヒト肝臓 Cyt b_5 においてそのN末端が block されたトリプシンペプチドを同定している。著者らもまたヒト赤血球 Cyt b_5 においてそれと同一のアミノ酸組成を有し、そのN末端は Edman 法で同定されなかったトリプシンペプチドを認めた。

7. ヒト赤血球 Cyt b₅ とヒト肝臓 Cyt b₅ (trypsin 処置) とはそれを構成するトリプシンペプチドのアミノ酸組成及びアミノ酸配列が等しいこと、また両者とも N 末端が検出されないペプチドを含むことから、ヒト赤血球 Cyt b₅ とヒト肝臓 Cyt b₅ の一次構造はその N 末端から第 92 残基までは同一であり、その N 末端は block されていると推定された。またヒト赤血球 Cyt b₅ においてのみ検出される 2 個の新たなトリプシンペプチドは、ヒト肝臓 Cyt b₅ の疎水性 "尾部" ペプチドに相当する部分を構成すると推定された。

稿を終るにあたって、御指導を賜った西田悦郎教授、研究の御指導と御校閲を賜った本学第一生化学講座米山良昌教授、杉田良樹筑波大学教授に深甚なる感謝の意を表します。本研究に際し種々御協力いただいた日本赤十字血液センター徳永栄一博士、笹川滋博士、本学第一病理学講座梶川欽一郎教授、三輪淳夫講師、本学癌研究所右田俊介教授、大阪大学蛋白質研究所成田耕造教授、崎山文夫助教授、金沢医科大学生化学講座岡田利彦教授、山口真潮助手、本学理学部板垣英治助教授、本学第一生化学講座浜本真三栄さんに深謝致します。

また産婦人科学教室、生化学教室の諸先生の御協力に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Strittmatter, C. F. & Ball, E. G. : Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 38, 19 (1952).
- 2) Yoshikawa, H. : J. Biochem., 38, 1 (1951).
- 3) Strittmatter, P. : The Enzymes, Volume 8, p.113, New York and London, Academic Press, 1963.
- 4) Ryan, K. J. & Engel, L. L. : J. Biol. Chem., 225, 103 (1957).
- 5) Mangum, J. H., Klingler, H. D. & North, J. A. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 1520 (1970).
- 6) Palade, G. E. & Siekevitz, P. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 671 (1956).
- 7) Bailie, M. & Morton, R. K. : Nature, 176, 111 (1955).
- 8) Raw, I., Molinari, R., Ferreira do Amaral, D. & Mahler, H. R. : J. Biol. Chem., 233, 225 (1958).
- 9) Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. & Bergstrand, A. : J. Cell. Biol., 32, 415 (1967).
- 10) Halloway, P. W. & Wakil, S. J. : J. Biol. Chem., 245, 1862 (1970).
- 11) Oshino, N., Imai, Y. & Sato, R. : J. Biochem., 69, 155 (1971).
- 12) Petragnani, N., Nogueira, O. C. & Raw, I. : Nature, 184, 1651 (1959).
- 13) Hultquist, D. E. & Passon, P. G. : Nature, New Biol., 229, 252 (1971).
- 14) Passon, P. G., Reed, D. W. & Hultquist, D. E. : Biochim. Biophys. Acta, 275, 51 (1972).
- 15) Passon, P. G. & Hultquist, D. E. : Biochim. Biophys. Acta, 275, 62 (1972).
- 16) Sugita, Y., Nomura, S. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 246, 6072 (1971).
- 17) 竹下正純・米山良昌 : 病態代謝, 1, p.52. (財)病態代謝研究会 (1975).
- 18) Ito, A. & Sato, R. : J. Biol. Chem., 243, 4922 (1968).
- 19) Spatz, L. & Strittmatter, P. : Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68, 1042 (1971).
- 20) Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 235, 2492 (1960).
- 21) Kajihara, T. & Hagihara, B. : J. Biochem., 63, 453 (1968).
- 22) Strittmatter, P. & Ozols, J. : J. Biol. Chem., 241, 4787 (1966).
- 23) Ozols, J. & Strittmatter, P. : Fed. Pro., 26, 2604 (1967).
- 24) Ozols, J. & Strittmatter, P. : Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 58, 264 (1967).
- 25) Ozols, J. & Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 243, 3367 (1968).
- 26) Ozols, J. & Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 243, 3376 (1968).
- 27) Tsugita, A., Kobayashi, M., Kajihara, T. & Hagihara, B. : J. Biochem., 64, 727 (1968).
- 28) Ozols, J. & Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 244, 6617 (1969).
- 29) Ozols, J. : J. Biol. Chem., 245, 4863 (1970).
- 30) Tsugita, A., Kobayashi, M., Tani, S., Kyo, S., Rayhid, M. A., Yoshida, Y., Kajihara, T. & Hagihara, B. : Pro. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 67, 442 (1970).
- 31) Nobrega, F. G. & Ozols, J. : J. Biol. Chem., 246, 1706 (1971).

- 32) Ozols, J. : J. Biol. Chem., 247, 2242 (1972).
- 33) Rashid, M. A., Hagihara, B., Kobayashi, M., Tani, S. & Tsugita, A. : J. Biochem., 74, 985 (1973).
- 34) Ozols, J. : Biochemistry, 13, 426 (1974).
- 35) Mathews, F. S., Argos, P. & Levine, M. : Cold. Spr. Harb. Symp. Quart. Biol., 35, 387 (1971).
- 36) Mathews, F. S., Levine, M. & Argos, P. : J. Mol. Biol., 64, 449 (1972).
- 37) Mathews, F. S. & Strittmatter, P. : J. Mol. Biol., 41, 295 (1969).
- 38) Krestinger, R. H., Hagihara, B. & Tsugita, A. : Biochim. Biophys. Acta, 200, 421 (1969).
- 39) Strittmatter, P., Rogers, M. J. & Spatz, L. : J. Biol. Chem., 247, 7188 (1972).
- 40) Enomoto, K. & Sato, R. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 1 (1973).
- 41) Strittmatter, P. & Velick, S. F. : J. Biol. Chem., 221, 253 (1956).
- 42) Crestfield, A. M., Moore, S. & Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 238, 622 (1963).
- 43) Moore, S. & Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 238, 622 (1963).
- 44) Edman, P. : Arch. Biochem., 22, 475 (1949).
- 45) Woods, K. R. & Wang, K. T. : Biochim. Biophys. Acta, 133, 369 (1967).
- 46) Matsuo, H., Fujimoto, Y. & Tatsuno, T. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 69 (1966).
- 47) Sanger, F. & Tuppy, H. : Biochem. J., 49, 481 (1951).
- 48) Katz, A. M., Dreyer, W. J. & Afbinsen, C. B. : J. Biol. Chem., 234, 2897 (1959).
- 49) Mendez, E. & Lai, C. Y. : Analytical Biochem., 65, 281 (1975).
- 50) Hirs, C. H. W., Moore, S. & Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 235, 633 (1960).
- 51) Omura, T. & Takesue, S. : J. Biochem., 67, 249 (1970).
- 52) Davis, J. D. : Ann. New York Acad. Sci., 121, 404 (1965).
- 53) Kuma, F. : Fed. Proc., 33, 1370 (1974).
- 54) Hultquist, D. E., Dean, R. T. & Douglas, R. H. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 28 (1974).
- 55) Okuda, T., Mihara, K. & Sato, R. : J. Biochem., 72, 987 (1972).
- 56) Spatz, L. & Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 248, 793 (1973).
- 57) Rogers, M. J. & Strittmatter, P. : J. Biol. Chem., 248, 800 (1973).
- 58) Visser, L., Robinson, N. C. & Tanford, C. : Biochemistry, 14, 1194 (1975).
- 59) Tajima, S., Enomoto, K. & Sato, R. : Arch. Biochem. Biophys., 172, 90 (1976).

Abstract

Cytochrome b_5 was purified from human erythrocytes, and the purified sample showed a single band on acryl amide disc electrophoresis. The primary structure of human erythrocyte cytochrome b_5 was determined and compared with that of human liver cytochrome b_5 . The following results were obtained.

1) The total number of amino acid residues of carboxymethylated human erythrocyte cytochrome b_5 was 132. The NH_2 -terminal residue of the protein was not detected by either Edman or dansylation method. The COOH -terminal analysis by tritium exchange method gave lysine as the terminal residue.

2) Peptide maps were prepared from the tryptic digests obtained from cytochrome b_5 of human erythrocytes and human liver. The map from liver cytochrome was composed of 9 spots and that from erythrocyte cytochrome 11 spots, whose 9 spots were considered to be identical with the 9 spots of the liver cytochrome.

3) On the peptide map of human erythrocyte cytochrome b_5 , two tryptic peptide which had no counterparts in the liver cytochrome, were detected. The one consisted of 24 amino acid residues, including one methionine residue, the other consisted of 12 amino acid residues. Each of the two tryptic peptides contained one lysine and one arginine residue.

4) The amino acid compositions of the 9 tryptic peptides of cytochrome b_5 obtained from human erythrocytes were identical with those of the corresponding peptides from human liver cytochrome. The amino acid compositions were also in accord with those reported by Ozols, except one tryptophane residue which was probably destroyed during hydrolysis.

5) Each of the sequences of a few amino acid residues at the NH_2 -terminal of the 8 peptides (except the peptide which will be described in 6) obtained from erythrocytes was the same as that of human liver cytochrome reported by Ozols.

6) A tryptic peptide showed the amino acid composition identical with that of the peptide of human liver, which, according to Ozols, contained blocked NH_2 -terminal. No NH_2 -terminal amino acid was detected on this peptide from human erythrocyte by the Edman method.

7) The results that both human erythrocyte cytochrome b_5 and liver cytochrome b_5 had common 9 tryptic peptides, and that both cytochromes showed no NH_2 -terminal amino acid residue, suggest that human erythrocyte cytochrome b_5 has the same primary structure as that of human liver cytochrome b_5 from NH_2 -terminal to 92 residue, and that its NH_2 -terminal is blocked as that of human liver cytochrome b_5 . Two tryptic peptides which have no identical peptide in human liver cytochrome b_5 are supposed to compose the region corresponding to hydrophobic "tail" peptide of human liver cytochrome b_5 .
